



PET

**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE**  
Bureau international

**DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)**

(51) Classification internationale des brevets 6 : <b>C12N 15/56, 7/01, 5/10, A61K 48/00</b>		A2	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/05255</b>
(21) Numéro de la demande internationale:	PCT/FR96/01200	(43) Date de publication internationale:	13 février 1997 (13.02.97)
(22) Date de dépôt international:	30 juillet 1996 (30.07.96)	(81) Etats désignés:	AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Données relatives à la priorité:	95/09289 31 juillet 1995 (31.07.95)	FR	Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): LUSKY, Monika [DE/DE]; Kappellenweg 18, D-07910 Freiburg (DE). MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, impasse de Reims, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: **HELPER VIRUSES FOR PREPARING RECOMBINANT VIRAL VECTORS**

**(54) Titre: VIRUS AUXILIAIRES POUR LA PREPARATION DE VECTEURS VIRAUX RECOMBINANTS**

**(57) Abstract**

Novel helper vectors are provided for complementing defective recombinant viral vectors, characterised in that they are provided with recombination sequences recognised by a recombinase. A complementation cell expressing the recombinase, and a method for preparing recombinant viral vectors as infectious viral particles for transferring and expressing genes of interest in a host organism or cell, are also provided. The invention is particularly suitable for use in gene therapy, especially in humans.

**(57) Abrégé**

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs auxiliaires (*helper* en anglais) permettant de compléter des vecteurs viraux recombinants défectifs, qui présentent la caractéristique d'être pourvus de séquences de recombinaison reconnues par une recombinase. Elle a également pour objet une cellule de complémentation exprimant la recombinase ainsi qu'une méthode de préparation des vecteurs viraux recombinants sous forme de particules virales infectieuses permettant le transfert et l'expression de gènes d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

10                   **VIRUS AUXILIAIRES POUR LA PREPARATION DE  
VECTEURS VIRAUX RECOMBINANTS**

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs auxiliaires (helper en anglais) permettant de complémenter des vecteurs viraux recombinants défectifs, qui  
15 présentent la caractéristique d'être pourvus de séquences de recombinaison reconnues par une recombinase. Elle a également pour objet une cellule de complémentation exprimant la recombinase ainsi qu'une méthode de préparation des vecteurs viraux recombinants sous forme de particules virales infectieuses permettant le transfert et l'expression de gènes d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte.  
20 L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

La possibilité de traiter les maladies humaines par thérapie génique est passée en quelques années du stade des considérations théoriques à celui des applications  
25 cliniques. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de nouveaux protocoles de thérapie génique pour diverses maladies génétiques ou acquises  
30 (maladies infectieuses et notamment virales comme le SIDA ou cancers). La grande majorité des protocoles décrits jusqu'à présent met en oeuvre des vecteurs viraux

- 2 -

pour transférer et exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter.

L'intérêt des adénovirus à titre de vecteurs de thérapie génique a déjà été évoqué dans de nombreux documents de l'art antérieur. En effet, les adénovirus ont un large 5 spectre d'hôtes, sont peu pathogènes et ne présentent pas les inconvénients liés aux rétrovirus puisqu'ils sont non-intégratifs et se repliquent également dans les cellules quiescentes. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb portant des régions agissant *en cis* (ITR 5' et région d'encapsidation en 5' du génome viral et ITR 3') et de plus d'une trentaine de 10 gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la replication virale et des gènes tardifs de structure (voir Figure 1).

Les gènes précoces sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome adénoviral (E1 à E4 ; E pour early signifiant précoce en anglais). Elles comportent 6 unités 15 transcriptionnelles qui possèdent leurs propres promoteurs. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais).

- 20 A l'heure actuelle, tous les vecteurs adénoviraux utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont dépourvus de la majeure partie de la région E1 essentielle à la replication, afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte (vecteurs de première génération). Cette délétion rend le génome viral déficient pour la replication. Cependant, les virus E1 peuvent être propagés dans une lignée 25 cellulaire qui complémente la fonction E1 pour générer une particule virale infectieuse. On utilise couramment la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, dans le génome de laquelle est intégrée l'extrémité 5' gauche de l'adénovirus de type 5 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72).
- 30 La plupart des vecteurs adénoviraux de l'art antérieur comportent des délétions supplémentaires. Certaines ont été introduites dans la région E3 dans le but

- 3 -

- d'accroître les capacités de clonage mais ne nécessitent pas d'être complémentées dans la mesure où la région E3 est non essentielle à la replication. Plus récemment, des vecteurs de seconde génération ont été proposés dans la littérature. Ils conservent les régions *en cis* (ITRs et séquences d'encapsidation) et comportent des délétions internes importantes visant à supprimer l'essentiel des gènes viraux dont l'expression peut être responsable de réponses inflammatoires chez l'hôte. A cet égard, un vecteur minimal déficient pour la totalité des régions virales codantes représente une alternative de choix.
- 10 Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement décrites dans la littérature. Dans un premier temps, le génome complet est constitué par recombinaison homologue dans la lignée 293 (voir notamment Graham et Prevec, 1991, *Methods in Molecular Biology*, Vol 7, *Gene Transfer and Expression Protocols* ; Ed E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) ou dans
- 15 *Escherichia coli* (technique décrite dans la demande française No 94 14470).
- Il est ensuite nécessaire de propager le vecteur afin de constituer un stock de particules virales le contenant. Cette étape de production est critique et doit permettre d'atteindre des titres élevés en particules infectieuses pour pouvoir
- 20 envisager un développement à grande échelle en vue de la préparation de lots cliniques. Si les vecteurs adénoviraux de première génération peuvent être propagés relativement facilement dans la lignée cellulaire 293, seule lignée de complémentation décrite à ce jour et capable d'exprimer efficacement E1, tel n'est pas le cas des vecteurs de seconde génération. En effet, selon le même principe de
- 25 base, un tel vecteur doit être complémenté pour les fonctions essentielles qu'il ne peut exprimer.
- La complémentation peut être fournie "*en trans*" par la lignée cellulaire employée (désignée lignée cellulaire de complémentation). Il est alors nécessaire de disposer
- 30 de nouvelles lignées complémentant plusieurs fonctions virales essentielles (E1 et E2, E1 et E4 ou E1, E2 et E4). Cependant, les diverses tentatives réalisées jusqu'à

- 4 -

présent laissent penser que la co-expression de plusieurs régions adénovirales est potentiellement toxique, de sorte que la lignée risque de ne pas être optimale en terme de capacité de croissance et rendement en particules virales, ces deux critères étant indispensables à une exploitation industrielle.

5

Une autre alternative repose sur l'emploi d'un élément viral supplémentaire, appelé "virus auxiliaire" introduit dans la lignée en même temps que le vecteur adénoviral (système à deux composantes). A l'heure actuelle, on utilise couramment un adénovirus déleté de la région E1 capable de synthétiser les produits d'expression des 10 autres régions adénovirales. La co-transfection d'un tel virus auxiliaire et d'un vecteur adénoviral dans la lignée 293 permet la formation de particules virales.

Cependant, un inconvénient majeur de cette méthode est que les cellules produisent une population mixte de particules virales, les unes comportant le vecteur recombinant et les autres le virus auxiliaire. En pratique, les préparations contiennent majoritairement des particules virales de virus auxiliaire, la contamination pouvant atteindre et même dépasser 90%. La présence du virus auxiliaire n'est pas souhaitable dans le cadre d'une thérapie appliquée à l'homme et, de ce fait, nécessite la mise en oeuvre de techniques physiques de séparation lourdes et coûteuses, telles 20 que l'ultracentrifugation. De plus, cette technologie est peu adaptée à la production de vecteurs de structure complexe, tels que les vecteurs de seconde génération, dans la mesure où, très souvent, le virus auxiliaire présente un avantage sélectif (replication plus rapide).

25 Le problème non résolu à ce jour de la production de particules de vecteur adénoviral recombinant à un titre élevé fait obstacle au développement de la thérapie génique.

On a maintenant construit un nouveau virus auxiliaire par insertion de répétitions 30 directes de part et d'autre de la région d'encapsidation. L'action d'une recombinase les reconnaissant entraîne l'excision du matériel génétique situé entre celles-ci. Cette

- 5 -

délétion n'a pas de conséquence notable sur l'expression des gènes viraux mais limite l'encapsidation du virus auxiliaire dans une particule virale. Ainsi, la mise en oeuvre du procédé à deux composantes précédemment décrit dans une lignée cellulaire exprimant la recombinase, permettra de produire des préparations enrichies en 5 particules de vecteur adénoviral d'intérêt.

- La présente invention découle de la mise au point d'une technique génétique basée sur l'emploi de séquences de recombinaison et d'une recombinase pour produire majoritairement le vecteur viral recombinant et limiter la contamination par le virus auxiliaire. Le but de la présente invention est de mettre à la disposition du public un nouveau virus auxiliaire capable d'exprimer les gènes qu'il porte (c'est à dire apte à exercer sa fonction de trans-complémentation) mais incapable d'être propagé en présence d'une recombinase. La solution apportée par la présente invention combine sécurité d'emploi (préparation enrichie en vecteur viral recombinant), simplicité 10 (production dans une lignée cellulaire conventionnelle en présence de recombinase) et efficacité (titre élevé compatible avec les besoins industriels). Elle est tout particulièrement adaptée à la production de vecteurs adénoviraux de seconde 15 génération.
- C'est pourquoi la présente invention a pour objet un virus auxiliaire pour la production d'un vecteur viral recombinant défectif pour la replication, caractérisé en ce qu'il comprend une première séquence de recombinaison en 5' et une seconde séquence de recombinaison en 3' d'une région essentielle à la propagation dudit virus auxiliaire ; lesdites séquences de recombinaison étant reconnues par une 20 recombinase.

Le terme "virus auxiliaire" désigne un vecteur capable de trans-complémer en totalité ou en partie un vecteur viral recombinant défectif pour la replication. Il est donc capable de produire au moins un polypeptide, précoce et/ou tardif, que le vecteur recombinant ne peut lui-même produire et qui est nécessaire à la constitution 25 d'une particule virale. "En totalité" signifie que le virus auxiliaire est apte à

- 6 -

complémenter l'ensemble du génome viral essentiel à la replication dont le vecteur viral recombinant est dépourvu et "en partie" signifie que la complémentation est limitée à une partie des fonctions défectives.

- 5 Dans le cadre de la présente invention, un virus auxiliaire dérive aussi bien d'un virus naturel tel que trouvé dans la nature que d'un virus dont le génome comporte des modifications par rapport à celui du virus parental dont il est issu. Ces modifications peuvent avoir été introduites *in vitro* par les techniques du génie génétique. Elles peuvent être diverses (délétion, mutation et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides) et localisées dans les régions codantes du génome viral ou en dehors de celles-ci. La modification peut, par exemple, permettre d'inactiver un ou plusieurs gène(s) essentiel(s) à la replication virale dans le but de le rendre également défectif c'est à dire incapable de replication autonome.
- 10
- 15 Les adénovirus humains de sérotype C et, plus particulièrement, de type 2, 5 ou 7 représentent des virus particulièrement préférés dans le cadre de l'invention. Cependant, on peut également avoir recours à d'autres adénovirus, notamment d'origine animale (canine, bovine, murine, aviaire, ovine, porcine ou simienne). On peut citer plus particulièrement les adénovirus canins CAV-1 ou CAV-2, aviaires DAV ou encore bovins Bad de type 3 (Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., 128, 171-176 ; Spibey et Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., 70, 165-172 ; Jouvenne et al., 1987, Gene, 60, 21-28 ; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., 76, 93-102). Mais, il peut aussi être intéressant de disposer d'un virus auxiliaire dérivant d'un poxvirus (virus de la vaccine, fowlpox, canarypox...), rétrovirus, virus de l'herpès, cytomégalovirus,
- 20
- 25 virus associé à l'adénovirus (AAV) ou encore à d'un virus hybride comportant des fragments de différentes origines.

La caractéristique du virus auxiliaire selon l'invention est qu'il comprend au moins deux séquences de recombinaison insérées en 5' et en 3' d'une séquence essentielle à sa propagation. Une séquence essentielle désigne tout ou partie d'un gène viral, des éléments nécessaires à l'expression comme un promoteur ou, de manière préférée,

. 7 .

des élément agissant *en cis* (ITR, LTR, séquence d'encapsulation...). A titre indicatif, les première et/ou seconde séquences de recombinaison peuvent être positionnées à l'intérieur ou immédiatement en 5' et 3' de la région essentielle jusqu'à plusieurs 100aines de pb.

5

- Au sens de la présente invention, une "séquence de recombinaison" est constituée par une séquence d'acide nucléique (ADN ou ARN) reconnue par une recombinase capable d'induire un évènement de recombinaison. Habituellement, une séquence de recombinaison a au moins 10 paires de base (pb), avantageusement de 15 à 80 pb,
- 10 de préférence de 20 à 60 pb et, de manière tout à fait préférée , de 30 à 50 pb. Selon un mode de réalisation avantageux, un virus auxiliaire selon l'invention comprend deux copies d'une séquence de recombinaison identiques ou étroitement apparentées (au moins 70% d'identité de séquence et, de manière préférée au moins 90%). C'est pourquoi on parlera de répétitions de séquences. A cet égard, la répétition peut être
- 15 inversée (les deux séquence de recombinaison présentes dans le virus auxiliaire ont une orientation réverse l'une par rapport à l'autre, l'une étant dans le sens 5' vers 3' et l'autre 3' vers 5') ou directe (même orientation 5' vers 3' ou 3' vers 5'). On préferera ce second cas de figure.
- 20 La recombinaison s'accompagne d'un appariement des séquences de recombinaison, d'un clivage d'une séquence cible à leur niveau et d'une ligation des extrémités clivés. L'enzyme capable de promouvoir la recombinaison est désignée "recombinase". La recombinaison entre des répétitions directes conduit à l'excision des séquences comprises entre celles-ci. Par contre, la recombinaison entre des répétitions inversées
- 25 entraîne l'inversion du matériel génétique localisé entre celles-ci.

D'une manière générale, les séquences de recombinaison et les recombinases sont décrites dans la littérature accessible à l'homme de l'art. Elles peuvent être d'une origine quelconque virale, phagique, procaryote ou eucaryote (levure, champignon

30 ou même eucaryote supérieur). En outre, elles peuvent être obtenues par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire (clonage, amplification par

- 8 -

réaction de chaîne (PCR pour Polymerase Chain Reaction en anglais) ou par synthèse chimique.

A titre d'exemples préférés, on mentionnera les séquences de recombinaison loxP  
5 (décrite dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1), FRT (SEQ ID NO: 2) et R (SEQ ID NO: 3) reconnues par les recombinases CRE, FLP et R, respectivement (voir par exemple l'article de revue Kilby et al., 1993, TIG 9, 413-420).

Un virus auxiliaire particulièrement adapté à la présente invention est dérivé du  
10 génome d'un adénovirus et comprend les ITRs 5' et 3', une région d'encapsidation et au moins un gène viral sélectionné parmi les gènes des régions E1, E2, E4 et L1-L5 et défectif dans le vecteur adénoviral recombinant ainsi qu'une première séquence de recombinaison en 5' et une seconde séquence de recombinaison en 3' de la région d'encapsidation. De préférence, celles-ci sont constituées par des séquences loxP  
15 positionnées dans la même orientation l'une par rapport à l'autre. Selon une première variante intéressante, la région d'encapsidation peut être atténuée (capacité réduite à l'encapsidation) pour favoriser l'encapsidation du vecteur viral recombinant. L'atténuation peut être obtenue par délétion d'une partie de la région d'encapsidation. Les moyens d'atténuer une région d'encapsidation sont indiquées dans la demande  
20 WO 94/28152.

Selon une seconde variante intéressante, le virus auxiliaire peut inclure une cassette d'expression d'une recombinase, et permettant notamment une expression inducible ou la production d'une recombinase inactive activable selon les besoins (définie ci-après). L'insertion a lieu dans une région appropriée du virus auxiliaire et, de préférence, en dehors de la région localisée entre les séquences de recombinaison.  
25

Selon un mode de réalisation particulier destiné à renforcer l'aspect sécurité, un virus auxiliaire selon l'invention peut comprendre une première séquence de recombinaison 30 et une seconde séquence de recombinaison en 5' et en 3' de plusieurs régions essentielles à sa propagation. Pour des raisons de simplicité de mise en oeuvre, on

- 9 -

préférera le cas où les séquences de recombinaison sont identiques ou apparentées de manière à être reconnues par une même recombinase.

La présente invention a également trait à une lignée cellulaire de complémentation  
5 comprenant un fragment d'ADN codant pour une recombinase. Elle peut être générée à partir de diverses lignées cellulaires par introduction de portions appropriées du génome viral et du fragment en question. On préfère tout particulièrement une lignée capable de complémenter la fonction E1 et/ou E4 d'un adénovirus. On mentionnera les lignées 293 (Graham, 1977, *supra*) et 1653 (décrite  
10 dans la demande WO 94/28152) modifiées par l'introduction du fragment d'ADN codant pour une recombinase.

Tous les moyens standards pour introduire un acide nucléique dans une cellule peuvent être employés dans le cadre de la présente invention (vecteur synthétique,  
15 viral, plasmide, ADN nu...). Bien entendu, ledit fragment d'ADN peut être intégré dans le génome cellulaire ou rester à l'état d'épisome. Aux fins de la présente invention, il peut comprendre les éléments nécessaires à son expression. Il s'agira, de préférence, d'éléments conférant une expression inductible en réponse à un inducteur. De tels éléments sont connus de l'homme du métier. On peut citer, à titre  
20 indicatif, les promoteurs inductibles par les métaux (promoteur du gène de la métallothionéine), par les hormones (promoteur comprenant des éléments répondant aux glucocorticoïdes GRE, aux progestérones PRE, aux oestrogènes ERE...), par des inducteurs viraux (promoteur comprenant la séquence TAR ou RRE répondant respectivement à la protéine TAT ou REV du virus de l'immunodéficience humaine  
25 VIH) ou par divers inducteurs cellulaires (promoteur comprenant la séquence UAS-Gal4 (pour Upstream Activating Sequence Gal4) répondant à Gal4 ou les opérateurs de l'opéron bactérien tétracycline répondant positivement au trans-activateur tétracycline tTA.  
30 Par ailleurs, un fragment d'ADN en usage dans la présente invention, code pour une recombinase capable de reconnaître les séquences de recombinaison présentes dans

- 10 -

un virus auxiliaire selon l'invention. On préfère employer une recombinase sélectionnée parmi le groupe constitué par CRE, FLP et R. Cependant, il est également possible d'avoir recours à un fragment d'ADN codant pour un homologue d'une recombinase dont la séquence est modifiée par rapport à la séquence native 5 mais exerçant une fonction similaire ou améliorée. Ces modifications peuvent résulter de la délétion, addition ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s). Il peut également s'agir d'une protéine hybride résultant de la fusion de polypeptides d'origines diverses, notamment d'un polypeptide ayant une activité de recombinase et l'autre d'un domaine de liaison. Une recombinase particulièrement adaptée à la 10 présente invention est constituée par une protéine hybride, désignée CRE-ER, résultant de la fusion de la recombinase CRE et du domaine de liaison au ligand du récepteur oestrogène humain ; (Metzger et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92). Celle-ci en tant que telle est inactive et son activité biologique est activée en présence d'un ligand hormonal comme l'oestradiol.

15 L'invention concerne également un procédé pour préparer une particule virale comprenant un vecteur viral recombinant, qui comprend les étapes suivantes :

- (a) Préparer un vecteur viral recombinant déficient pour la replication ;
- (b) Préparer un virus auxiliaire selon l'invention ;
- 20 (c) Introduire le vecteur viral recombinant et le virus auxiliaire dans une lignée cellulaire appropriée ;
- (d) Cultiver ladite lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre la production de la particule virale en présence d'une recombinase fonctionnelle capable de reconnaître lesdites première et
- 25 (e) Récupérer la particule virale dans la culture cellulaire.

Au sens de la présente invention, un vecteur viral recombinant défectif dérive d'un virus dans le génome duquel certaines séquences ont été déletées, rendues non 30 fonctionnelles, mutées ou encore substituées par d'autres séquences et, plus particulièrement, un fragment d'ADN hétérologue (normalement non présent dans

- 11 -

le virus parental). L'insertion a lieu dans une région appropriée du génome viral, de manière à permettre son expression dans une cellule hôte. Une cellule hôte est constituée par toute cellule eucaryote infectable par une particule virale contenant ledit vecteur viral recombinant.

5

Le fragment d'ADN hétérologue en usage dans la présente invention, peut être issu d'un organisme eucaryote, d'un procaryote ou d'un virus autre que celui dans lequel il est inséré. Il peut être isolé par toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art, par exemple par clonage, PCR ou synthèse chimique. Il peut s'agir d'un  
10 fragment de type génomique (comportant tout ou partie de l'ensemble des introns), de type ADN complémentaire (ADNc, dépourvu d'intron) ou de type mixte (comportant tout ou partie d'au moins un intron). Par ailleurs, il peut coder pour un ARN antisens et/ou un ARN messager (ARNm) qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt celui-ci pouvant être (i) intracellulaire, (ii) membranaire présent  
15 à la surface de la cellule hôte ou (iii) sécrété dans le milieu extérieur. En outre, il peut s'agir d'un polypeptide tel que trouvé dans la nature (natif) ou d'une portion de celui-ci (tronqué) ou également d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore muté et présentant des propriétés biologiques améliorées ou modifiées.

20

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser un fragment d'ADN codant pour une cytokine (interleukine dont l'IL-2, interféron, facteur stimulateur de colonies...), un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation (Facteur VII, Facteur VIII, Facteur IX...), la protéine CFTR (Cystic  
25 Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator en anglais), l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme (uréase rénine, thrombine...), un inhibiteur d'enzyme (inhibiteur d'une protéase virale,  $\alpha$ -1-antitrypsine...), un polypeptide à effet antitumoral (produit de gènes supresseurs de tumeurs, polypeptide stimulant le système immunitaire...), un polypeptide capable d'inhiber  
30 ou ralentir le développement d'une infection bactérienne, virale ou parasitaire (polypeptide antigénique, variant trans-dominant...), un anticorps, une toxine, une

- 12 -

immunotoxine et enfin un marqueur (luciférase,  $\beta$ -galactosidase, produit conférant la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, cette liste n'est pas limitative et d'autres gènes peuvent également être employés.

5 Avantageusement, le fragment d'ADN hétérologue est placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans la cellule hôte. Par "éléments nécessaires", on désigne l'ensemble des éléments permettant la transcription dudit fragment d'ADN en ARN (ARN antisens ou ARNm) et la traduction de l'ARNm en polypeptide. Ces éléments comprennent un promoteur régulable ou constitutif, 10 lequel peut être hétérologue ou au contraire homologue au virus parental. On peut citer, à titre d'exemples, le promoteur du gène PGK (Phospho Glycérate Kinase) humain ou murin, le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur TK (Thymidine Kinase) du virus HSV-1 (Herpes Simplex Virus) et les promoteurs adénoviraux E1A et MLP. Les éléments 15 nécessaires peuvent, en outre, inclure des éléments additionnels (séquence intronique, séquence signal de sécrétion, séquence de localisation nucléaire, site d'initiation de la traduction, signal poly A de terminaison de la transcription...). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une variante préférée, on indique que le vecteur viral peut également comporter un fragment d'ADN codant pour la recombinase.

20 Il est à la portée de l'homme du métier de générer un vecteur viral recombinant en usage dans la présente invention. Il saura bien évidemment adapter la technologie en fonction des données spécifiques (type de vecteur, fragment d'ADN hétérologue...). Selon une variante préférée, les vecteurs susceptibles d'être mis en oeuvre dans le 25 cadre de la présente invention, sont des vecteurs adénoviraux recombinants défectifs pour l'ensemble des fonctions virales ou encore toutes les fonctions à l'exception de E4. De tels vecteurs sont décrits dans la demande internationale WO 94/28152.

On obtient un virus auxiliaire selon l'invention par insertion dans un génome viral 30 d'une première et d'une seconde séquence de recombinaison de part et d'autre d'une région essentielle à la replication et, de préférence de la région d'encapsidation celle-

- 13 -

- ci pouvant être atténuée ou non. L'homme du métier connaît les régions essentielles à la replication d'un virus et est apte à réaliser une telle construction en appliquant les techniques classiques de biologie moléculaire. Selon la variante mentionnée précédemment, il peut également comprendre un fragment d'ADN codant pour une 5 recombinase et, notamment, l'hybride CRE-ER. Selon un mode de mise en oeuvre préférentiel, un virus auxiliaire selon l'invention et le vecteur viral recombinant dont il permet la production, dérivent du même virus parental et, de manière tout à fait préférée, d'un adénovirus.
- 10 Après l'étape de construction proprement dite, le virus auxiliaire et le vecteur viral recombinant sont introduits dans une lignée cellulaire appropriée. Tous les moyens standards pour introduire un acide nucléique dans une cellule peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention, par exemple la transfection, l'électroporation, la microinjection, la lipofection, l'adsorption et la fusion de protoplastes. On indique 15 qu'ils peuvent être co-introduits (façon concommittante) ou introduits de manière séparée (le virus auxiliaire selon l'invention préalablement ou postérieurement au vecteur viral recombinant).
- Bien que toute lignée cellulaire puisse être employée dans le cadre de la présente 20 invention, on préfère notamment une lignée de complémentation. On aura recours à une lignée de l'art antérieur (293, 1653...) lorsqu'on met en oeuvre un vecteur viral recombinant ou un virus auxiliaire comprenant le fragment d'ADN codant pour la recombinase. En revanche, lorsque ce n'est pas le cas, on utilisera une lignée cellulaire de complémentation selon l'invention.
- 25
- Après la transfection, la lignée cellulaire est cultivée dans des conditions appropriées pour permettre la production de particules virales. Un procédé selon l'invention peut, en outre, comprendre une étape d'amplification préalablement à l'étape de culture en présence de la recombinase fonctionnelle. Cette étape a pour but d'augmenter les 30 quantités de virus auxiliaire et de vecteur viral recombinant afin d'améliorer les rendements. Elle peut être réalisée par culture dans toute lignée permissive ou dans

- 14 -

la lignée appropriée en usage dans la présente invention avant l'ajout, l'expression ou l'activation de la recombinase.

- Cette première étape de culture est suivie d'une seconde réalisée en présence d'une 5 recombinase fonctionnelle capable de reconnaître lesdites première et seconde séquences de recombinaison. Dans le cadre du procédé selon l'invention, celle-ci peut être ajoutée à la culture cellulaire, par exemple sous forme substantiellement pure. Toutefois, selon une autre variante tout à fait préférée et déjà évoquée, la recombinase est produite par l'un des constituants du procédé selon l'invention, à 10 savoir le vecteur viral recombinant ou de manière préférée, le virus auxiliaire ou la lignée cellulaire. Une fois produite sous forme fonctionnelle, la recombinase provoquera l'excision de la région essentielle du virus auxiliaire localisée entre les séquences de recombinaison, dans le but d'empêcher ou de réduire sa propagation.
- 15 Par ailleurs, lorsqu'on met en oeuvre une recombinase dont l'expression est inductible par un inducteur ou la protéine hybride CRE-ER dont l'activité biologique est dépendante d'un ligand hormonal, l'étape de culture en présence de la recombinase fonctionnelle est réalisée par l'ajout dans le milieu de culture de l'inducteur ou du ligand.
- 20 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux destiné à renforcer la sécurité d'un procédé selon l'invention, le virus auxiliaire et le vecteur viral recombinant sont défectifs et peuvent se complémenter réciproquement, en totalité ou en partie. Une variante intéressante consiste à employer (i) un adénovirus auxiliaire selon l'invention 25 défectif pour les fonctions E1 et E4 et comprenant les séquences loxP en 5' et en 3' de la région d'encapsidation, (atténuée ou non) (ii) un vecteur recombinant défectif pour toutes les fonctions à l'exception de E4 et (iii) une lignée cellulaire 293 produisant la recombinase hybride CRE-ER. Selon une autre alternative avantageuse, un procédé selon l'invention met en oeuvre (i) un adénovirus auxiliaire 30 selon l'invention défectif pour les fonctions E1 et E4, comprenant les séquences loxP en 5' et en 3' de la région d'encapsidation (atténuée ou non) et produisant la

- 15 -

recombinase hybride CRE-ER,(ii) un vecteur recombinant défectif pour toutes les fonctions à l'exception de E4 et (iii) une lignée cellulaire conventionnelle 293.

Les particules virales sont récupérées de la culture cellulaire, du milieu ou après lyse  
5 des cellules. Avantageusement, un procédé selon l'invention comprend une étape supplémentaire de purification des particules de vecteur viral recombinant. Bien que le choix de la technique soit large et à la portée de l'homme du métier, on peut citer plus particulièrement l'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césum ou de sucre.

10

Enfin, l'invention vise également un procédé pour préparer une particule virale comprenant un vecteur viral recombinant par le moyen d'un virus auxiliaire, selon lequel le rapport particules virales de vecteur adénoviral recombinant sur celles de virus auxiliaire est supérieur à 50%, avantageusement supérieur à 60%, de 15 préférence, supérieur à 70% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 80%.

L'invention a également trait à une particule de vecteur viral recombinant obtenue par un procédé selon l'invention ainsi qu'à une cellule eucaryote hôte selon l'invention. Ladite cellule hôte est avantageusement une cellule de mammifère et, de 20 préférence, une cellule humaine et peut comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou non intégrée (épisome). Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

25

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, une particule de vecteur viral recombinant obtenue par un procédé selon l'invention ou une cellule eucaryote hôte selon l'invention, en association avec un support acceptable d'un point de vue 30 pharmaceutique. La composition selon l'invention est en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que :

- 16 -

- des maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathie, celle de Duchêne et de Becker...),
- 5 - des cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus,
- des maladies virales, comme l'hépatite B ou C et le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise résultant de l'infection par le VIH), et
- 10 - des maladies virales récurrentes, comme les infections virales provoquées par le virus de l'herpès.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace  
15 d'un agent thérapeutique ou prophylactique à un support tel qu'un diluant. Une composition selon l'invention peut être administrée par aérosol, par voie locale ou encore systémique. Les voies d'administration envisageables dans le cadre de la présente invention peuvent être intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intrapulmonaire,  
20 nasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) recombinant(s) à transférer. En particulier, les particules virales selon l'invention peuvent être  
25 formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages), avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{11}$  ufp. La formulation peut également inclure un adjuvant acceptable d'un point de vue pharmaceutique.  
30 Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'une particule de vecteur viral recombinant obtenue par un procédé selon l'invention

- 17 -

- ou d'une cellule eucaryote hôte selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal et, préférentiellement, par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transférer ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.
- 10 L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'une particule de vecteur viral recombinant obtenue par un procédé selon l'invention ou d'une cellule eucaryote hôte selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.
- 15 La présente invention est plus complètement décrite en référence aux Figures suivantes et à l'aide des exemples suivants.
- La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100), indiquant l'emplacement des 20 différents gènes.
- La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG4701 dans lequel la région 5' gauche de l'adénovirus 5 est modifié par l'insertion de répétitions directes LoxP de part et d'autre (en position 161 et 460) de la région d'encapsidation (psi).
- 25 La Figure 3 est une représentation schématique du vecteur pTG8595 déléte des régions E1, E3 et E4 et comportant une cassette d'expression du gène LacZ contrôlé par le promoteur MLP et une séquence polyA (pA).
- 30 La Figure 4 est une représentation schématique du vecteur pTG4707 déléte des régions E1, E3 et E4 et comprenant deux répétitions directes LoxP de part et d'autre

- 18 -

de la région d'encapsidation psi.

La Figure 5 est une représentation schématique du vecteur pTG4662, vecteur adénoviral recombinant déléte des régions E1 et E3 et portant la même cassette  
5 LacZ que pTG8595.

La Figure 6 est une représentation schématique du vecteur pTG4667 vecteur adénoviral recombinant déléte des régions E1, E3 et des ORFs 1 à 4 de E4 et portant la même cassette LacZ que pTG8595.

10

La Figure 7 est une représentation schématique du vecteur pTG4702 qui dérive du vecteur précédent par insertion d'une cassette d'expression de la protéine hybride CRE-ER (indiquée cre et hER) à la place de celle de LacZ.

## 15 EXEMPLES

Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales  
20 de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial.  
Les étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens sont réalisées dans  
la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) SK (Hubacek et Glover, 1970, J. Mol. Biol. 50,  
25 111-127) ou BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). On utilise  
préférentiellement cette dernière souche pour les étapes de recombinaison homologue. Les techniques d'amplification par PCR sont connues de l'homme de l'art  
(voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité  
par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la  
30 réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage  
des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I

- 19 -

d'*E. coli* (Klenow).

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la technique  
5 au phosphate de calcium (Maniatis et al., *supra*), mais tout autre protocole peut également être employé, tel que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection d'une cellule sélectionnée ou les méthodes basées sur l'emploi de liposomes. Quant aux conditions de culture, elles sont classiques sauf lorsque spécifié.

10

Dans les exemples qui suivent, on a recours aux lignées cellulaires suivantes :

Lignée 293 dérivée de rein embryonnaire humain (Graham et al, 1977, *supra*)  
qui résulte de l'intégration dans ses chromosomes de l'extrémité 5' du génome  
15 de l'Ad5 (ITR5', séquence d'encapsidation et région E1) (disponible à l'ATCC  
sous la référence 1573).

Lignée TG1653 (décrise dans la demande internationale WO94/28152,  
exemple 8) qui dérive de la lignée 293 transformée de manière stable par le  
20 plasmide pTG1653 portant la région E4 de l'Ad5 (nt 32800 à 35826) et la  
cassette d'expression du gène *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) de  
résistance à la puromycine (Morgenstern et Land, 1990, Nucleic Acids Res.  
18, 3587-3596).

25 Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées.

Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leurs positions dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de  
30 données Genebank sous la référence M73260.

- 20 -

EXEMPLE 1 : Constitution d'un virus auxiliaire.

Cet exemple décrit la construction d'un virus auxiliaire adénoviral défectif pour les fonctions E1 et E4 et comprenant une séquence de recombinaison loxP positionnée  
5 de part et d'autre de la région d'encapsidation.

La séquence loxP est portée par les oligonucléotides oTG6374 et oTG6522 (SEQ ID NO: 4 et 5). Ceux-ci sont réassociés puis introduits dans le site *Hind*III du vecteur p poly II (Lathe et al., Gene 57, 193-201), pour donner pTG4691.

10

Le vecteur pTG8343 provient de l'insertion dans le vecteur p poly II d'une partie de l'extrémité 5' du génome adénoviral, à savoir les séquences s'étendant des nucléotides (nt) 1 à 458 et 3328 à 5788. Celui-ci est linéarisé par *Sa*I et mis en ligation avec le fragment *Sa*I-*Xho*I isolé de pTG4691 portant la séquence loxP. On  
15 obtient pTG4695 qui comprend une séquence loxP en position 450 du génome adénoviral soit en 3' de la région d'encapsidation. On clone une seconde séquence loxP sous forme d'un fragment *Sma*I-*Pvu*II purifié de pTG4691 dans le vecteur précédent linéarisé par *Af*II (position 161) et traité à la Klenow. Le vecteur pTG4701 ainsi obtenu comporte deux répétitions directes loxP encadrant la région  
20 d'encapsidation psi (Figure 2).

La région d'encapsidation modifiée est échangée contre son homologue génomique par la technique de recombinaison homologue. A cet effet, la souche *E. coli* est co-transformée avec le fragment *Bg*I de pTG4701 et le vecteur pTG8595 (Figure 3)  
25 digéré par *Cla*I. Ce dernier est un vecteur adénoviral recombinant déléte des régions E1 (nt 459-3328), E3 (nt 28592-30470) et E4 (nt 32800-35826) et comportant une cassette d'expression du gène LacZ sous le contrôle du promoteur MLP à la place de la région E1. Le vecteur recombiné est désigné pTG4707 (Figure 4). Après transfection dans la lignée de complémentation TG1653 (E1<sup>+</sup>, E4<sup>+</sup>) et amplification,  
30 les virus Ad TG4707 sont purifiés sur gradient de chlorure de césium afin de constituer un stock viral titrant environ 2 x 10<sup>8</sup> pfu/ml.

- 21 -

EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur adénoviral recombinant produisant une recombinase.

- Cet exemple décrit la construction d'un vecteur adénoviral exprimant la protéine hybride CRE-ER. En absence d'oestrogène, cette dernière est produite sous une forme inactive mais en présence de l'hormone, elle adopte une conformation active. Le vecteur adénoviral est dépourvu de l'essentiel des régions E1 et E3 et de la partie de la région E4 autre que les ORFs 6 et 7 (Cadre de Lecture Ouvert pour Open Reading Frame en anglais). L'expression de ces deux gènes est suffisante pour assurer la fonction E4 sans nécessité de complémentation (Ketner et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17, 3037-3048). Deux types de vecteurs ont été construits. Dans le premier (pTG4708), le gène CRE-ER est placé sous le contrôle du promoteur SV40 alors que dans le second (pTG5630), il est dirigé par le promoteur CMV.
- En premier lieu, le vecteur pTG1653 portant la région E4 de l'Ad5 (nt 32800 à 35826 ; voir WO 94/28152), est digéré par *Avr*II et *Bg*II puis traité par la Klenow avant d'être religué sur lui-même. On obtient pTG4660 qui porte une cassette d'expression des ORFs 6 et 7 sous le contrôle du promoteur homologue E4. Celle-ci est introduite dans un vecteur adénoviral par recombinaison homologue. A cet effet, on choisit le vecteur pTG4662 (Figure 5) qui comporte l'ITR 5' et les séquences d'encapsidation (nt 1 à 458), une cassette d'expression du gène LacZ à la place de la région E1 et les séquences adénovirales restantes déletées de la région E3 (nt 3329 à 27870 et 30749 à 35935). La souche *E. coli* BJ est co-transformée par le fragment *Fsp*I-*Mun*I issu de pTG4660 et pTG4662 digérés par *Sph*I. Cet événement de recombinaison permet de générer pTG4667 (Figure 6) dans lequel la cassette ORFs 6 et 7 remplace la région sauvage E4.

A. *Construction du vecteur pTG4708*

- En parallèle, la cassette d'expression de la recombinase hybride CRE-ER est isolée du vecteur pCre-ER (Metzger et al., 1995, *supra*) sous forme d'un fragment *Sal*I et

- 22 -

clonée dans le vecteur pTG8343 préalablement linéarisé par cette même enzyme. On obtient pTG4699 et pTG4700 qui diffèrent par l'orientation de la cassette.

Les vecteurs pTG4702 (Figure 7) et pTG4703 sont obtenus par recombinaison  
5 homologue entre un fragment *SgrAI-BstEII* purifié de pTG4699 et pTG4700 respectivement et le vecteur adénoviral pTG4667 linéarisé par *ClaI*. Ils portent la cassette d'expression CRE-ER (orientation différente pour chacun d'entre eux) à la place de la région E1 et sont dépourvus de la région E3 et des ORFs 1 à 4 de E4. Ils sont transfectés dans les cellules 293 et 1653 afin de s'assurer que l'expression de la  
10 recombinase n'est pas toxique à la croissance cellulaire et à la multiplication virale.

La construction d'un vecteur adénoviral, en outre, défectif pour la région E2 peut être réalisée à partir des constructions précédentes par traitement par l'enzyme *AscI* et religation. On isole les clones qui ont réintégré le fragment *AscI* mais en  
15 orientation opposée par rapport au vecteur parental. Les candidats peuvent être déterminés par simple digestion enzymatique avec des enzymes dont les sites sont présents sur le fragment, par exemple *BamHI* et sont désignés pTG4708. Cette inversion de l'orientation a pour but d'interrompre les unités de transcription codant pour E2A, la polymérase et l'hexon et de rendre la fonction E2 défective. Il est  
20 également possible d'introduire des délétions de tout ou partie de la région E2.

*B. Construction du vecteur pTG5630*

Le vecteur pTG4667 est digéré par l'enzyme *SnaBI* puis religué. On sélectionne le  
25 vecteur pTG5613 similaire à pTG4667 mis à part l'inversion du fragment adénoviral *SnaBI* (positions 10307 à 25173) recouvrant une grande partie des séquences codantes de la région E2. Cette inversion permet de générer un virus défectif incapable de produire les produits d'expression fonctionnels de E2.

30 Par ailleurs, les séquences codant pour CRE-ER sont isolées par digestion *EcoRI* et traitées par la Klenow avant d'être introduites en aval du promoteur CMV, donnant

- 23 -

lieu à pTG5625. On obtient le vecteur pTG5630 par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-Bs/EII* isolé de pTG5625 et le vecteur pTG5617 linéarisé par *ClaI*. pTG5630 est défectif pour les fonctions E1 et E2, déleté de la majeure partie de E3, et porte la cassette "promoteur CMV - CRE-ER" à la place de E1 en orientation inverse par rapport à l'ITR 5'.

EXEMPLE 3 : Procédé de préparation de particules virales d'un vecteur adénoviral par le système CRE et loxP

10 A. *Mise en oeuvre du vecteur pTG4708 et de l'auxiliaire pTG4707*

Dans cet exemple, on utilise :

- (1) un vecteur adénoviral (pTG4708) défectif pour l'ensemble des fonctions adénovirales à l'exception de E4 et portant les séquences codant pour la recombinase CRE-ER,
- 15 (2) un virus auxiliaire (pTG4707) défectif pour les fonctions E1, E3 et E4 et contenant deux répétitions directes loxP placées de part et d'autre de la région d'encapsidation, et
- (3) la lignée cellulaire de complémentation 293 complémentant la fonction  
20 E1.

Les vecteurs pTG4707 et pTG4708 sont co-transfектés dans les cellules 293 et cultivées dans un premier temps dans un milieu classique ne contenant pas d'oestrogène. Les particules virales peuvent être formées dans les cellules qui  
25 comportent les deux vecteurs puisqu'ils se complémentent mutuellement. En effet, les protéines E2 sont produites à partir du virus auxiliaire, les protéines E4 à partir de vecteur adénoviral et les protéines E1 sont fournies par la lignée cellulaire. Par ailleurs, la protéine hybride CRE-ER est produite sous sa forme inactive puisque le milieu de culture n'est pas supplémenté en hormone de sorte que le génome du virus  
30 auxiliaire est apte à être encapsidé. Les plages ainsi produites contiennent une population mixte de virus, une partie contenant le génome du vecteur adénoviral et

- 24 -

l'autre partie celui du virus auxiliaire. Cette étape permet une amplification de la quantité de virus dans le but d'améliorer les titres.

L'étape de production sélective des particules de vecteur adénoviral est réalisée en  
5 introduisant dans le milieu de culture de l'estradiol selon les conditions détaillées dans Metzger et al. (1995, *supra*). La présence d'estradiol va permettre d'activer la recombinase CRE-ER qui, une fois fonctionnelle, est apte à induire un événement de recombinaison entre les séquences loxP. Les virus générés dans ces conditions sont purifiés, l'ADN est isolé et la délétion de la région d'encapsidation vérifiée soit  
10 par digestion enzymatique ou hybridation à une sonde appropriée complémentaire à celle-ci selon la technologie de Southern.

B. *Mise en oeuvre du vecteur pTG5630 et de l'auxiliaire pTG4707*

15 2,5 à 5 µg de vecteur pTG5630 sont transfectés dans la lignée 293 dans les conditions classiques. Le lendemain les cellules transfectées sont surinfectées par le virus auxiliaire AdTG4707 à raison d'environ 0,04 pfu/cellule et cultivées dans un milieu DMEM dépleté en rouge de phenol (ce dernier étant susceptible de présenter une activité oestrogène). Deux conditions de culture ont été étudiées en parallèle :  
20 milieu supplémenté en β- oestradiol (Sigma ; E4389) à une concentration de  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  M après le troisième passage et milieu non supplémenté. La culture cellulaire est récoltée à 4 jours post-infection et une partie de la récolte amplifiée par passages successifs sur des cellules 293 fraîches. L'autre partie est conservée pour les analyses d'ADN viral. On observe une différence significative de l'état des cellules selon les  
25 conditions de culture. En effet, la cytopathie est moins prononcée en présence d'oestradiol qu'en son absence, ceci à compter du troisième passage, ce qui laisse présager une différence au niveau de la production virale.

Afin de vérifier ce point, l'ADN des virus produits lors des quatre premiers passages  
30 est isolé d'un même volume de culture, digéré par l'enzyme *Mun*I et analysé par Southern à l'aide d'une sonde radioactive complémentaire à une séquence en amont

- 25 -

de la région E4. Après hybridation, on visualise un fragment *MunI* de 1,7 kb dans le cas des virus issus du vecteur pTG5630 et un fragment *MunI* de 1,1 kb dans le cas des virus auxiliaires AdTG4707. Ces conditions permettent d'apprécier la quantité relative de virus d'intérêt et auxiliaires générés à chaque cycle d'amplification.

5

Dans les conditions où la recombinase CRE-ER est inactive (en absence d'oestrogène), on observe une amplification simultanée des deux types de virus se traduisant par un signal de plus en plus intense au fur et à mesure des passages. En revanche, lorsque le milieu de culture est supplémenté en oestradiol, le signal 10 correspondant au virus auxiliaire diminue alors que celui spécifique pour AdTG5630 augmente à chaque passage. Ces résultats indiquent que l'activation de la recombinase s'accompagne d'une amplification préférentielle du virus d'intérêt.

L'excision de la région d'encapsidation du virus auxiliaire est mise en évidence par 15 analyse Southern sur les préparations d'ADN viral digéré par l'enzyme *ApaII* et en mettant en oeuvre une sonde spécifique de la région d'encapsidation s'hybridant à un fragment de 3,7 kb dans le cas du virus AdTG5630 et à un fragment de soit 800 pb dans le cas du virus auxiliaire intègre ou 400 pb dans le cas où les séquences d'encapsidation bordées par les sites *loxP* sont excisées.

20

L'intensité du signal correspondant au fragment de 3,7 kb augmente au fur et à mesure des cycles d'amplification quelles que soient les conditions de culture alors que celui correspondant au fragment 800 pb ne croît qu'en absence d'oestradiol. Par contre, en présence de l'hormone, le signal correspondant au virus auxiliaire 25 s'affaiblit. A forte exposition, on peut mettre en évidence une bande à 400 pb indiquant que la région d'encapsidation des virus auxiliaires est excisée par l'action de la recombinase.

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que le système CRE-LoxP peut être 30 adapté aux adénovirus pour réduire la contamination des préparations adénovirales par le virus auxiliaire.

- 26 -

EXEMPLE 4 : Constitution d'une lignée stable exprimant la recombinase hybride CRE-ER.

Le vecteur pCre-ER est transfété, de manière conventionnelle, dans les cellules 293  
5 en même temps qu'un vecteur de sélection (par exemple pRC-CMV conférant la résistance à la néomycine disponible commercialement (Invitrogen), pTG1643 conférant la résistance à la puromycine décrit dans WO 94/28156). Après transfection, les cellules sont cultivées en milieu sélectif contenant l'antibiotique et on isole les clones résistants (désignés 293/CRE-ER) qui sont testés pour leur  
10 capacité à produire un vecteur adénoviral.

On agit selon la même technologie pour générer une lignée 1653 (complémentant les fonctions adénovirales E1 et E4) exprimant le produit du gène CRE-ER.

15 Les cellules 293/CRE-ER ainsi générées sont co-transfектées par le virus auxiliaire pTG4707 et un vecteur adénoviral recombinant défectif pour toutes les fonctions à l'exception de E4 (tels que ceux décrits dans WO 94/28152) puis cultivées dans un milieu classique de manière à générer une population mixte et amplifiées de particules virales. Après un certain temps, le milieu de culture est remplacé par un  
20 milieu contenant de l'oestradiol afin de produire la recombinase sous sa forme active et empêcher la production de particules virales AdTG4707.

La lignée 1653/CRE-ER sera utile pour la préparation de vecteurs défectifs pour l'ensemble des fonctions essentielles (voir WO 94/28156). La technologie employée est comparable à celle décrite précédemment à savoir : co-transfection par le virus auxiliaire pTG4707 et un vecteur adénoviral recombinant minimum, culture en milieu sélectif non supplémenté en oestradiol pendant un temps suffisant puis ajout de l'hormone dans le milieu de culture et récupération des particules virales produites.  
25

- 27 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Transgene S.A.
- (B) RUE: 11, rue de Molsheim
- (C) VILLE: Strasbourg
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
- (H) TELECOPIE: (33) 88 27 91 11

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveaux virus auxiliaires pour la préparation de vecteurs viraux recombinants.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- 28 -

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Bacteriophage P1
- (B) SOUCHE: loxP (locus de crossing over)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATAACTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Saccharomyces cerevisiae*
- (B) SOUCHE: FRT

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GAAGTTCCCTA TACTTTCTAG AGAATAGGAA CTTC

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- 29 -

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Zygosaccharomyces rouxii*

(B) SOUCHE: Site R

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TTGATGAAAG AATACGTTAT TCTTTCATCA A

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 45 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide de synthese (loxP)

(B) SOUCHE: oTG6374

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AGCTATAACT TCGTATAATG TATGCTATAC GAAGTTATCT CGAGA

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 30 -

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: oligonucleotide de synthese (loxP)
- (B) SOUCHE: oTG6522

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

AGCTTCTCGA GATAACTTCG TATAGCATAC ATTATACGAA GTTAT

45

## Revendications

1. Un virus auxiliaire pour la production d'un vecteur viral recombinant défectif pour la replication, caractérisé en ce qu'il comprend une première séquence de recombinaison en 5' et une seconde séquence de recombinaison en 3' d'une région essentielle à la propagation dudit virus auxiliaire ; lesdites séquences de recombinaison étant reconnues par une recombinase.
2. Un virus auxiliaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est déficient pour la replication.
3. Un virus auxiliaire selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites séquences de recombinaison sont positionnées en 5' et 3' de la région d'encapsidation dudit virus.
4. Un virus auxiliaire selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites première et seconde séquences de recombinaison sont positionnées dans la même orientation l'une par rapport à l'autre.
5. Un virus auxiliaire selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites première et seconde séquences de recombinaison sont sélectionnées parmi le groupe constitué par les séquences loxP, FRT et R.
6. Un virus auxiliaire selon l'une des revendications 1 à 5, pour la production d'un vecteur adénoviral recombinant défectif pour la replication, qui dérive du génome d'un adénovirus et comprend les ITRs 5' et 3', une région d'encapsidation et au moins un gène viral sélectionné parmi les gènes des régions E1, E2, E4 et L1-L5, ledit gène étant défectif dans ledit vecteur adénoviral recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une première séquence de recombinaison en 5' et une seconde séquence de recombinaison en 3' de ladite région d'encapsidation.

- 32 -

7. Un virus auxiliaire selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de tout ou partie de la région E1 et/ou E4.
8. Un virus auxiliaire selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un fragment d'ADN codant pour une recombinase.
9. Une lignée cellulaire de complémentation comprenant un fragment d'ADN codant pour une recombinase.
10. Une lignée cellulaire de complémentation selon la revendication 9 et un virus auxiliaire selon la revendication 8, dans lesquels ledit fragment d'ADN code pour une recombinase sélectionnée parmi le groupe constitué par CRE, CRE-ER, FLP et R.
11. Une lignée cellulaire de complémentation selon la revendication 9 ou 10, dérivant de la lignée 293.
12. Un procédé pour préparer une particule virale comprenant un vecteur viral recombinant, qui comprend les étapes suivantes :
  - (a) Préparer un vecteur viral recombinant déficient pour la replication ;
  - (b) Préparer un virus auxiliaire selon l'une des revendications 1 à 8 et 10 ;
  - (c) Introduire le vecteur viral recombinant et le virus auxiliaire dans une lignée cellulaire appropriée ;
  - (d) Cultiver ladite lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre la production de la particule virale en présence d'une recombinase fonctionnelle capable de reconnaître lesdites première et seconde séquences de recombinaison ; et
  - (e) Récupérer la particule virale dans la culture cellulaire.
13. Un procédé selon la revendication 12, qui comprend en outre une étape d'amplification probablement à l'étape (d).

- 33 -

14. Un procédé selon la revendication 12 ou 13, selon lequel, au cours de l'étape (d), la recombinase est ajoutée à la culture cellulaire.
15. Un procédé selon la revendication 12 ou 13, selon lequel ledit virus auxiliaire est selon la revendication 8 et ladite lignée cellulaire est la lignée cellulaire de complémentation 293.
16. Un procédé selon la revendication 15, qui comprend les étapes suivantes :
  - (a) Préparer un vecteur adénoviral recombinant défectif pour l'ensemble des fonctions adénovirale à l'exception de E4 ;
  - (b) Préparer un virus auxiliaire défectif pour les fonctions E1 et E4 et comprenant (i) les séquences LoxP en 5' et en 3' de la région d'encapsidation et (ii) un fragment d'ADN codant pour la recombinase hybride CRE-ER ;
  - (c) Introduire le vecteur viral recombinant et le virus auxiliaire dans une lignée cellulaire 293 ;
  - (d) Cultiver ladite lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre la production de la particule virale et, après un temps suffisamment long, poursuivre la culture dans un milieu comprenant de l'oestradiol ; et
  - (e) Récupérer la particule virale dans la culture cellulaire.
17. Un procédé selon la revendication 12 ou 13, selon lequel ledit virus auxiliaire est selon l'une des revendications 1 à 7 et ladite lignée cellulaire selon l'une des revendications 9 à 11.
18. Un procédé selon la revendication 17, qui comprend les étapes suivantes :

- 34 -

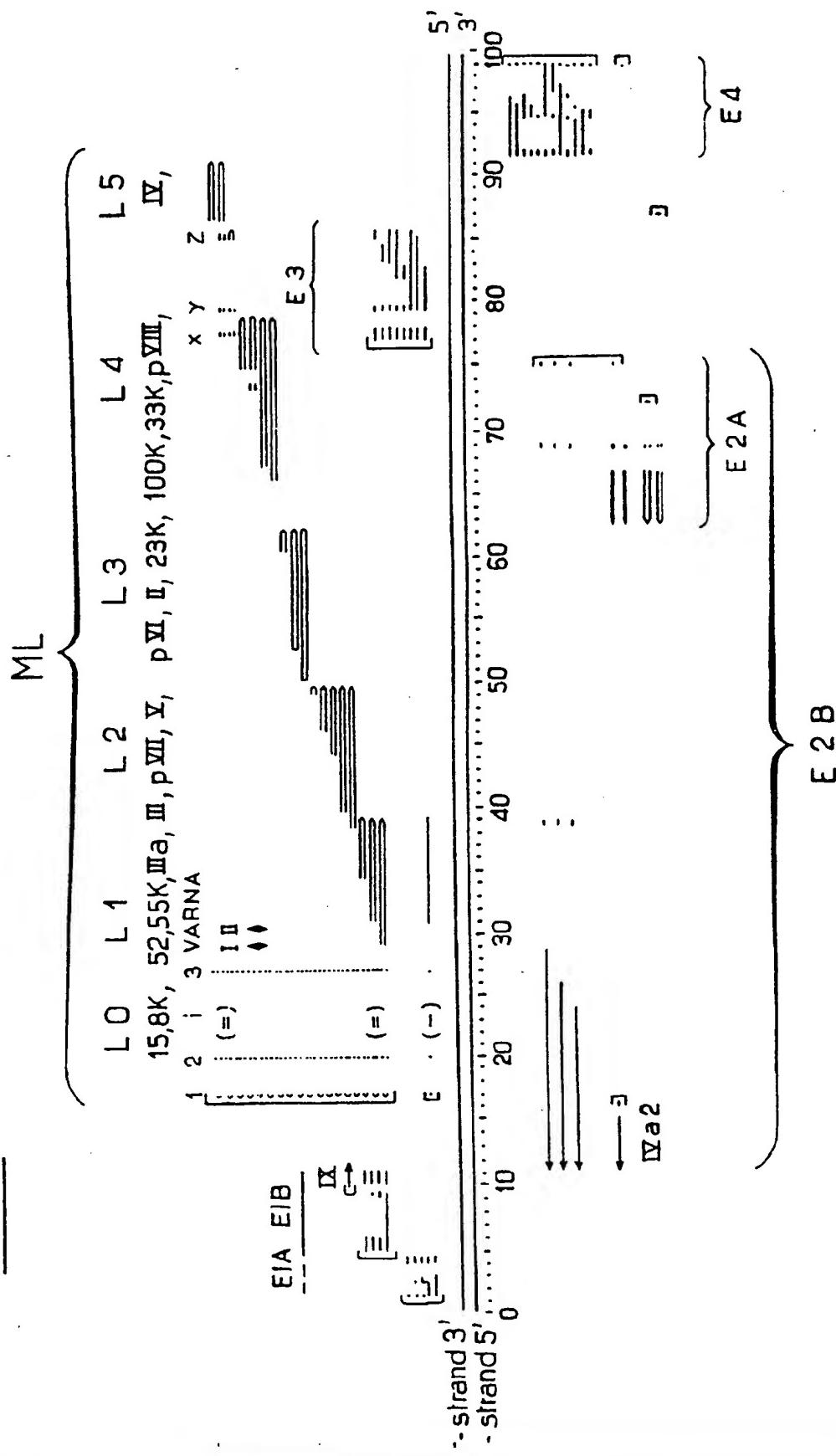
- (a) Préparer un vecteur adénoviral recombinant défectif pour l'ensemble des fonctions adénovirales à l'exception de E4 ;
  - 5 (b) Préparer un virus auxiliaire défectif pour les fonctions E1 et E4 et comprenant les séquences LoxP en 5' et 3' de la région d'encapsidation ;
  - 10 (c) Introduire le vecteur viral recombinant et le virus auxiliaire dans une lignée cellulaire 293 comprenant un fragment d'ADN codant pour la recombinase hybride CRE-ER.
  - 15 (d) Cultiver ladite lignée cellulaire dans des conditions appropriées pour permettre la production de la particule virale et, après un temps suffisamment long, poursuivre la culture dans un milieu comprenant de l'oestradiol ; et
  - (e) Récupérer la particule virale dans la culture cellulaire.
19. Un procédé selon l'une des revendications 12 à 18, qui comprend en outre  
20 une étape de purification du vecteur viral recombinant.
20. Un procédé pour préparer une particule virale comprenant un vecteur viral recombinant par le moyen d'un virus auxiliaire, selon lequel le rapport particules virales de vecteur viral recombinant sur virus auxiliaire est  
25 supérieur à 50%, avantageusement supérieur à 60%, de préférence supérieur à 70% et, de manière tout à fait préférée supérieur à 80%.
21. Une particule virale obtenue par un procédé selon l'une des revendications  
12 à 20.
- 30 22. Une cellule hôte eucaryote comprenant une particule virale selon la

- 35 -

revendication 21.

23. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique une particule virale selon la revendication 21 ou une  
5 cellule hôte eucaryote selon la revendication 22, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
24. Particule virale selon la revendication 21 ou cellule hôte eucaryote selon la revendication 22 pour utilisation comme médicament.

1 / 7

FIG. 1

2 / 7

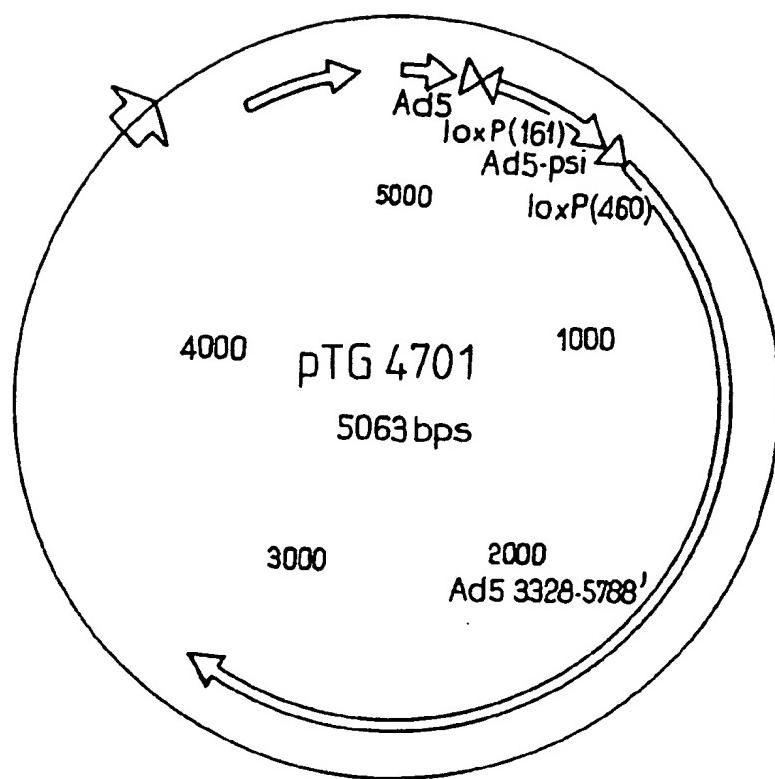
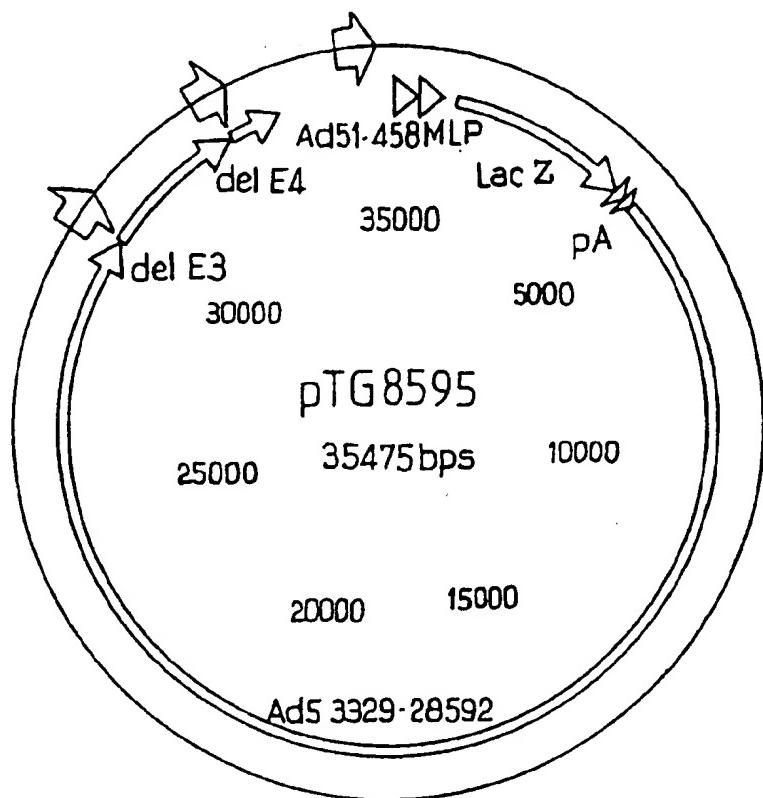


FIG. 2

3 / 7

FIG\_3

4 / 7

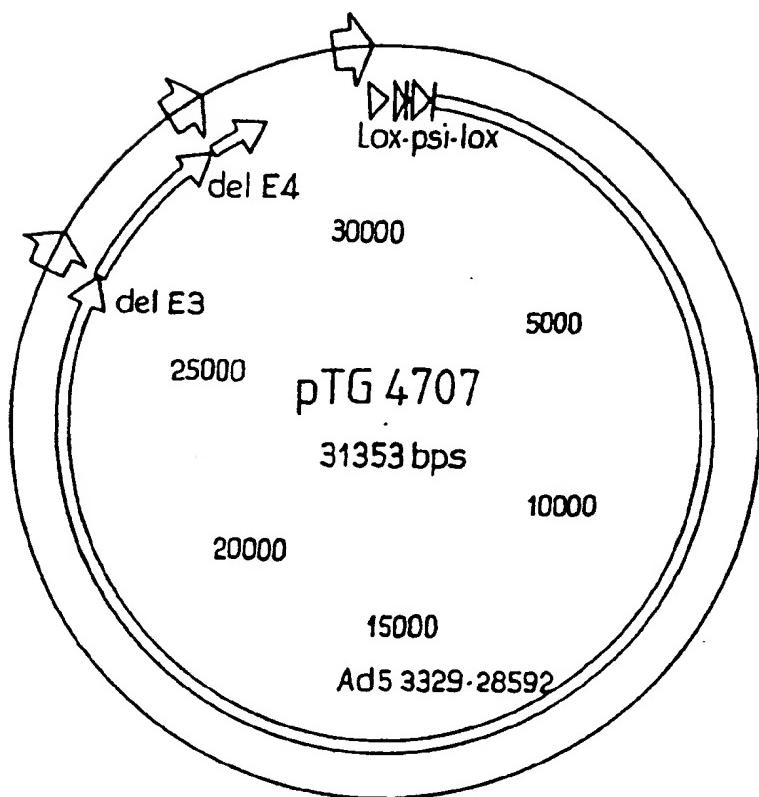


FIG 4

5 / 7

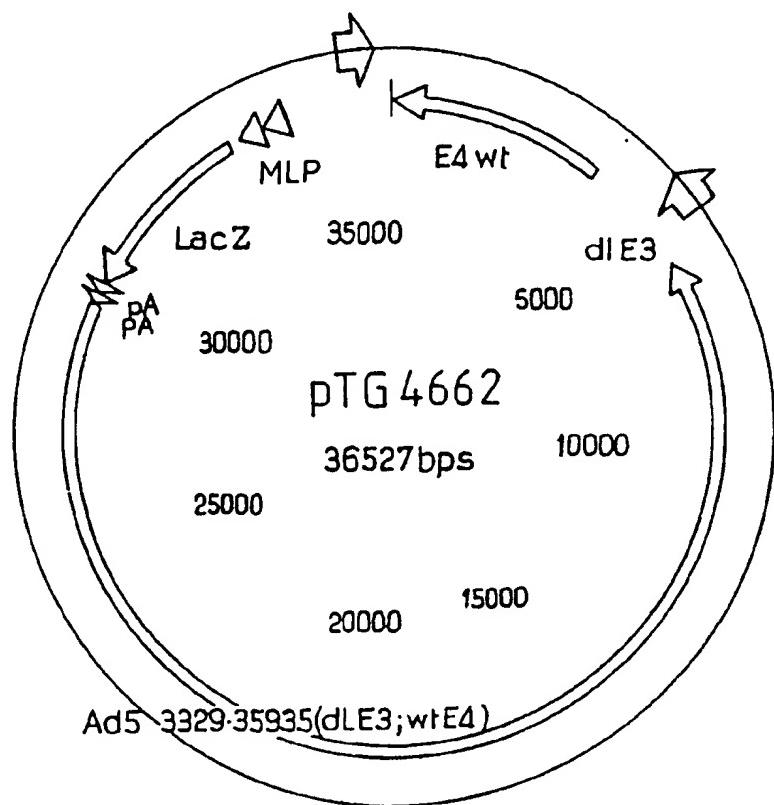


FIG. 5

6 / 7

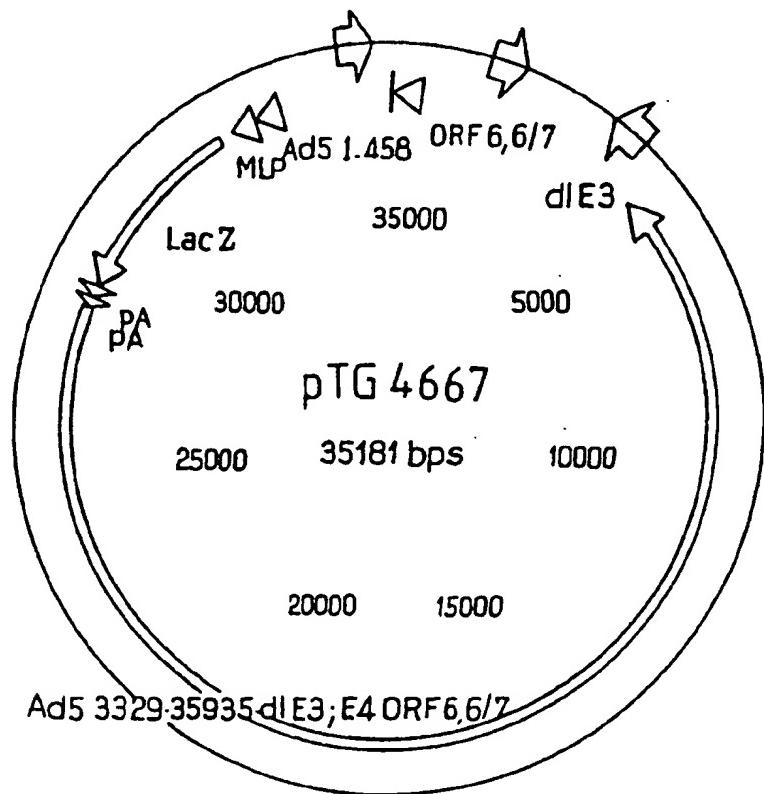


FIG. 6

7 / 7

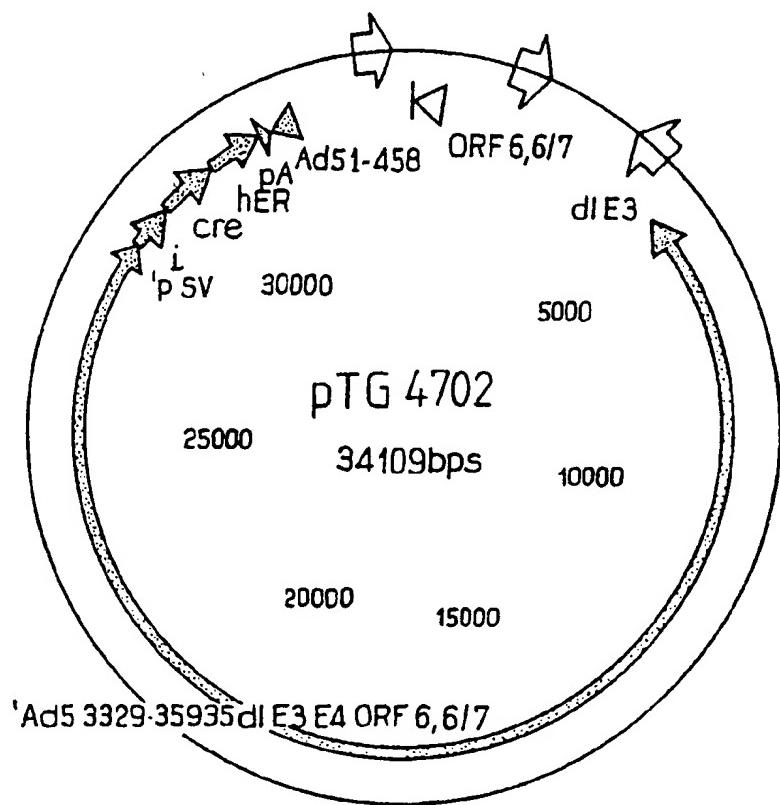


FIG. 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/96/01200

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages in	Relevant to claim No.
Y	J. MOL. BIOL. (1993), 230(1), 174-85 CODEN: JMOBAK; ISSN: 0022-2836, XP000568383 AYRES, ELAINE K. ET AL: "Precise deletions in large bacterial genomes by vector-mediated excision (VEX). The trfA gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several Gram-negative hosts" see the whole document ---	1-24
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1987), 84(24), 9108-12 CODEN: PNASA6; ISSN: 0027-8424, XP002002088 SAUER, BRIAN ET AL: "Site-specific insertion of DNA into a pseudorabies virus vector" see the whole document ---	1-24

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

22 January 1997

Date of mailing of the international search report

05.02.97

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

## Authorized officer

Gurdjian, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/FR 96/01200

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR,A,2 707 664 (CENTRE NAT RECH SCIENT ; ROUSSY INST GUSTAVE) 20 January 1995 see the whole document ---	1-24
Y	EP,A,0 488 528 (APPLIED IMMUNESCIENCES) 3 June 1992 see the whole document ---	1-24
A	NUCLEIC ACIDS RES. (1989), 17(1), 147-61 CODEN: NARHAD;ISSN: 0305-1048, XP002002089 SAUER, BRIAN ET AL: "Cre -stimulated recombination at loxP -containing DNA sequences placed into the mammalian genome" see the whole document ----	1-24
A	EP,A,0 300 422 (DU PONT) 25 January 1989 see the whole document -----	1-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Application No  
PCT/EP 96/01200

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR-A-2707664	20-01-95	AU-A-	7264694	13-02-95
		CA-A-	2144040	26-01-95
		CN-A-	1113390	13-12-95
		CZ-A-	9500639	15-11-95
		EP-A-	0667912	23-08-95
		FI-A-	951138	13-04-95
		WO-A-	9502697	26-01-95
		HU-A-	72558	28-05-96
		JP-T-	8501703	27-02-96
		NO-A-	950939	10-03-95
		NZ-A-	269156	26-03-96
		PL-A-	308122	24-07-95
		SK-A-	31295	08-05-96
		ZA-A-	9405012	20-02-95
<hr/>				
EP-A-0488528	03-06-92	US-A-	5173414	22-12-92
		AT-T-	130870	15-12-95
		CA-A,C	2054517	01-05-92
		DE-D-	69114997	11-01-96
		DE-T-	69114997	18-04-96
		JP-A-	5308975	22-11-93
		US-A-	5589377	31-12-96
		US-A-	5354678	11-10-94
<hr/>				
EP-A-0300422	25-01-89	AU-B-	610608	23-05-91
		AU-A-	1920188	27-01-89
		DE-A-	3876327	14-01-93
		JP-A-	1112986	01-05-89
<hr/>				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No

PCT/FR 96/01200

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 C12N15/86 C12N7/01 C12N5/10 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
 CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents id	no. des revendications visées
Y	J. MOL. BIOL. (1993), 230(1), 174-85 CODEN: JMOBAK; ISSN: 0022-2836, XP000568383 AYRES, ELAINE K. ET AL: "Precise deletions in large bacterial genomes by vector-mediated excision (VEX). The trfA gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several Gram-negative hosts" voir le document en entier ---	1-24
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1987), 84(24), 9108-12 CODEN: PNASA6; ISSN: 0027-8424, XP002002088 SAUER, BRIAN ET AL: "Site-specific insertion of DNA into a pseudorabies virus vector" voir le document en entier ---	1-24
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou citer pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"V" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Janvier 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.02.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentzaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

D-  
nde Internationale No  
PCT/96/01200

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR,A,2 707 664 (CENTRE NAT RECH SCIENT ; ROUSSY INST GUSTAVE) 20 Janvier 1995 voir le document en entier ---	1-24
Y	EP,A,0 488 528 (APPLIED IMMUNESCIENCES) 3 Juin 1992 voir le document en entier ---	1-24
A	NUCLEIC ACIDS RES. (1989), 17(1), 147-61 CODEN: NARHAD; ISSN: 0305-1048, XP002002089 SAUER, BRIAN ET AL: "Cre -stimulated recombination at loxP -containing DNA sequences placed into the mammalian genome" voir le document en entier ---	1-24
A	EP,A,0 300 422 (DU PONT) 25 Janvier 1989 voir le document en entier -----	1-24

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

nde Internationale No

PCT/FR 96/01200

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR-A-2707664	20-01-95	AU-A- 7264694 CA-A- 2144040 CN-A- 1113390 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 WO-A- 9502697 HU-A- 72558 JP-T- 8501703 NO-A- 950939 NZ-A- 269156 PL-A- 308122 SK-A- 31295 ZA-A- 9405012		13-02-95 26-01-95 13-12-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 26-01-95 28-05-96 27-02-96 10-03-95 26-03-96 24-07-95 08-05-96 20-02-95
EP-A-0488528	03-06-92	US-A- 5173414 AT-T- 130870 CA-A,C 2054517 DE-D- 69114997 DE-T- 69114997 JP-A- 5308975 US-A- 5589377 US-A- 5354678		22-12-92 15-12-95 01-05-92 11-01-96 18-04-96 22-11-93 31-12-96 11-10-94
EP-A-0300422	25-01-89	AU-B- 610608 AU-A- 1920188 DE-A- 3876327 JP-A- 1112986		23-05-91 27-01-89 14-01-93 01-05-89